

Docket No. 219148US0CONT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Thomas RITTER, et al.

GAU: 1636 #8

SERIAL NO: 10/068,916

EXAMINER: MARVICH

FILED: February 11, 2002

FOR: GENETICALLY MODIFIED T-CELLS, METHOD FOR PRODUCING THEM AND USE THEREOF

REQUEST FOR PRIORITY

ASSISTANT COMMISSIONER FOR PATENTS
WASHINGTON, D.C. 20231

SIR:

- ☒ Full benefit of the filing date of International Application Number PCT/DE01/02184 filed June 8, 2001, is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §120.
- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Provisional Application Serial Number , filed , is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119(e).
- ☒ Applicants claim any right to priority from any earlier filed applications to which they may be entitled pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119, as noted below.

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicants claim as priority:

COUNTRY
GERMANY

APPLICATION NUMBER
100 28 833.2

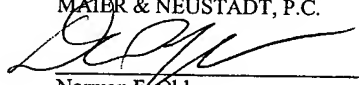
MONTH/DAY/YEAR
June 9, 2000

Certified copies of the corresponding Convention Application(s)

- ☒ is submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee
- ☐ were filed in prior application Serial No. filed
- ☐ were submitted to the International Bureau in PCT Application Number
Receipt of the certified copies by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.
- ☐ (A) Application Serial No.(s) were filed in prior application Serial No. filed ; and
- ☐ (B) Application Serial No.(s)
☐ are submitted herewith
☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee

Respectfully Submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAYR & NEUSTADT, P.C.


Norman F. Oblon

Registration No. 24,618



22850

Tel. (703) 413-3000
Fax. (703) 413-2220
(OSMMN 03/02)

Daniel J. Pereira, Ph.D.
Registration No. 45,518

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 100 28 833.2

Anmeldetag: 09. Juni 2000

Anmelder/Inhaber: Universitätsklinikum Charité, Medizinische
Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin,
Berlin/DE

Erstanmelder: Dr. Thomas Ritter,
Berlin/DE

Bezeichnung: Retroviral modifizierte T-Zellen, Verfahren
zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung

IPC: C 12 N, A 61 K

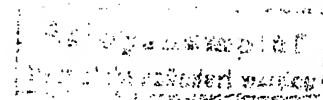
**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 04. Oktober 2002
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident

Im Auftrag

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Faust', is written over the text 'Im Auftrag'.

Faust



Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft in vitro retroviral modifizierte T-Zellen zur Verhinderung der allogenen Transplantatrejektion in vivo, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung. Hierbei werden T-Zellen des Transplantatempfängers in vitro durch Zellen des Transplantatspenders oder durch Zellen, die dominante MHC-Moleküle exprimieren, stimuliert und gleichzeitig mit Hilfe von Retroviren, die immunmodulierende Gene exprimieren, transduziert. Die retroviral modifizierten alloreaktiven T-Zellen sind dadurch gekennzeichnet, dass sie ein therapeutisches Gen, wie z.B. IL-4, IL-10 oder IL-12p40 exprimieren.

Retroviral modifizierte T-Zellen, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung ✓

Beschreibung

5 Die Erfindung betrifft in vitro retroviral modifizierte T-Zellen zur Verhinderung der allogenen Transplantatrejektion in vivo, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung. Hierbei werden T-Zellen des Transplantatempfängers in vitro durch Zellen des Transplantatspenders oder durch Zellen, die dominante MHC-Moleküle exprimieren, stimuliert und gleichzeitig mit Hilfe von Retroviren, die immunmodulierende Gene exprimieren, transduziert. Aufgrund der

 10 gewählten Versuchsbedingungen, die zur Generierung und Expansion von allo-spezifischen T-Zellen führt, wandern die T-Zellen nach der in vivo Applikation spezifisch in das allogene Transplantat ein und können dort die immunmodulierenden Gene exprimieren. Die Erfindung erlaubt es, die Abstoßung allogener Transplantate (Zellen, Gewebe, Organe) effektiv zu verhindern und stellt damit ein wirksames Mittel sowohl zur Toleranzinduktion als auch zur

 15 Erhaltung von Toleranz gegenüber allogenen Transplantaten (Zellen, Gewebe, Organe) in der Transplantationsmedizin dar.

Trotz der Erfolge der konventionellen Immunsuppression mit Cyclosporin A, FK506, Glukokortikoiden oder OKT3 (monoklonaler Antikörper (mAk) gegen CD3), ist das Problem der Transplantatabstoßung noch lange nicht zufriedenstellend gelöst. Eine lebenslange

 20 medikamentöse Immunsuppression führt fast immer zu gravierenden Nebenwirkungen und kann die chronische Rejektion nur selten komplett inhibieren. Ziel der Transplantationsforschung ist es, mit einer Kurzzeittherapie die lebenslange Akzeptanz eines fremden Organs zu erreichen. In Tiermodellen gibt es bereits einige Ansätze, die dieser Forderung nahe kommen. Die Basis zum Verständnis dieser Ansätze stellt die genaue Analyse

 25 des abgestoßenen oder tolerierten Gewebes dar. Sie zeigt während der akuten Rejektion immer eine massive Infiltration des Gewebes mit Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten. Die Tatsache, dass die Depletion der CD3-positiven Zellen durch OKT3 das Transplantat vor Abstoßung schützt, zeigt die kritische Rolle der T-Lymphozyten (Ode-Hakim et al., 1996). Ebenso sind immundefiziente SCID-Mäuse (ohne B- und T-Zellen) nicht in der

 30 Lage, ein fremdes Organ abzustößen. Innerhalb der T-Zellpopulation scheinen Th-Zellen die Initiatoren der Rejektion zu sein. Dies wurde in CD4 bzw. CD8 T-Zell-depletierten Mäusen gezeigt. Während die CD8 depletierten Mäuse das Transplantat abstoßen können, ist dies den CD4 depletierten nicht möglich (Campos et al., 1995). Geht man vom Th1/Th2 Paradigma aus

(Mosmann et al., 1989), sind in der frühen Phase der akuten Abstoßung hauptsächlich Th1-Zellen beteiligt. Auch in Rattenmodellen konnte mit semiquantitativer PCR ein Anstieg charakteristischer Th1-Zytokine (IFN- γ , IL-2) im Transplantat gezeigt werden (Siegling et al., 1994a). Die aus dem Organ gewonnenen CD4-Zellen produzieren nach *in vitro* Restimulation ebenfalls vorwiegend Th1-Zytokine.

Allen Behandlungsprotokollen gemeinsam ist das Ziel, die potentiell schädigenden Th1-Zellen in ihrer Entstehung oder Funktion zu hemmen. Während die konventionellen Methoden dies mit einer globalen Depletion oder Inhibition der Lymphozyten versuchen, greifen neuere Ansätze in den T-Zellaktivierungsprozess ein. Monoklonale Antikörper gegen den CD4-Rezeptor modifizieren das TCR-Signal (Lehmann et al., 1992; Siegling et al., 1994b). CTLA4-Ig bindet an die B7-Moleküle der antigen-präsentierenden Zellen (APC's) und blockt somit kostimulatorische Signale (Sayegh et al., 1995). Am Ende dieser kurzen Behandlung (ca. 2 Wochen) entsteht in vielen Modellen eine stabile Toleranz (Cobbold & Waldmann, 1998). Vermittler dieser Toleranz sind wahrscheinlich regulatorische CD4-Zellen.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Übertragung dieser Zellen auf syngene Tiere ebenfalls eine Toleranz erzeugt. Dieses Phänomen wurde erstmals 1993 als „infektiöse Toleranz“, beschrieben (Qin et al., 1993). Allerdings gelang der Versuch nur in einem schwachen "Abstoßungsmodell". Mit Hilfe eines nicht-depletierenden Ak gegen CD4 (RIB 5/2) gelang es, dieses auch in einem starken Rejektionsmodell zu zeigen (Onodera et al., 1996a). Mit Hilfe der semiquantitativen PCR konnte ein stark erhöhter Interleukin-4 (IL-4) mRNA-Spiegel in den transplantierten Organen (auch nach mehreren Übertragungen) nachgewiesen werden. Dies weist auf die Bedeutung von Th-2 Zytokinen, vor allem Interleukin-4, hin.

Neben IL-4 sind eine Reihe von Zytokinen in der Lage, Th1-vermittelte Immunreaktionen zu modulieren. IL-4 induziert die Differenzierung von naiven CD4⁺ T-Zellen in Th2-Zellen, wird von diesen gebildet und hemmt in hohem Maße die Sekretion von IFN- γ . Damit wird die Entwicklung einer Th1-Antwort supprimiert (Banchereau, 1991). IL-10, welches vor allem von Monozyten/Makrophagen und T-Zellen gebildet wird, hat eine ganze Reihe von anti-inflammatorischen Eigenschaften. So wurde unter anderem gezeigt, dass i) IL-10 die MHC-Klasse II Expression auf Monozyten inhibiert, ii) die Produktion inflammatorischer Zytokine wie IFN- γ , IL-1 und IL-8 und TNF- α hemmt und iii) die Proliferation allogen aktivierter Lymphozyten unterdrückt (de Waal Malefyt et al., 1991a; de Waal Malefyt et al., 1991b; Ralph et al., 1992; Cassatella et al., 1993; Qin et al., 1997). Als ein zusätzlicher, T-Zellunabhängiger Differenzierungsfaktor für Th1 Zellen wurde IL-12 beschrieben. Dieses

Zytokin wird von Makrophagen und B-Zellen sezerniert, führt zur Erhöhung der IFN- γ Produktion von NK-Zellen, CD4⁺ T-Zellen und CD8⁺ T-Zellen und induziert damit die Differenzierung naiver CD4⁺ T-Zellen zu Th1-Zellen (Hsieh et al., 1993; Germann et al., 1993; Kennedy et al. 1994). IL-12 ist ein heterodimeres Glykoprotein, das aus einer 40kDa (p40) und einer 35kDa (p35) Untereinheit besteht. Die IL-12p40 Untereinheit ist in der Lage, die Effekte des Heterodimers spezifisch zu inhibieren. Nach Mattern et al. (1993) hemmen Überstände von mit Maus IL-12 p40 transfizierten COS Zellen *in vitro* verschiedene IL-12 Effekte. IL-12p40 inhibiert die Proliferation von PHA und IL-12 aktivierten Splenozyten.

Bei experimentellen und klinischen Untersuchungen konnte bei Allotransplantationen gezeigt werden, dass, in der Phase der akuten Abstoßung, die Expression unterschiedlichster Zytokine erfolgt, deren zelluläre Herkunft Th1-Zellen, Th2-Zellen, zytotoxische CD8⁺ T-Zellen, aber auch nicht-lymphozytäre Zellen (Makrophagen, Endothelzellen, Mastzellen) zuzuordnen ist (Dallman et al., 1991). Es liegen Hinweise vor, dass Th1-Zytokine eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der akuten Transplantatabstoßung spielen. Dies beruht auf Untersuchungen der Zytokingenexpressionsmuster in Transplantaten von toleranten Tieren. Hinweise hierfür bieten Untersuchungen zur wirkungsvollen Toleranzinduktion mit anti-CD4 monoklonalen Antikörpern (Benjamin and Waldmann, 1988; Takeuchi, 1992; Siegling et al., 1994a). Der Mechanismus ist nicht völlig klar, zumal eine Depletion von CD4⁺ T-Zellen für die Toleranzinduktion nicht notwendig ist. Eine Toleranzinduktion durch anti-CD4 Behandlung ist mit einer deutlichen Suppression der Th1-Zytokinexpression im Transplantat assoziiert. Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass Th1-Zytokine eine wesentliche Rolle bei der Allograftabstoßung einnehmen (Siegling et al., 1994a, Lehmann et al., 1997).

Die Bedeutung von Th2-Zytokinen ist dagegen weniger klar. Bei toleranten Tieren führte die alleinige Th2-Antwort nicht zur Transplantatabstoßung. Die Persistenz von Th2-Zytokinen in Transplantaten der Tiere könnte als Epiphänomen gewertet werden, jedoch auch entscheidend für eine Hemmung der Th1-Antwort sein und damit für die Transplantatreaktion ein entscheidendes Kriterium bedeuten. Bestätigt wird diese Vermutung durch Beobachtungen, dass eine temporäre Th1/Th2-Zytokinimbalance der T-Zellantwort unmittelbar nach Antigenkontakt zur dauerhaften Prägung der Immunantwort führen kann (Scott, 1991). Erste Untersuchungen *in vitro* zeigen im Transplantationsmodell, dass sich auch die Funktion von Transplantat-infiltrierenden Zellen beeinflussen läßt. Die Frequenz von IFN- γ produzierenden Zellen konnte unter dem Einfluss von rekombinantem IL-4 um 50-70% gesenkt werden (Merville et al., 1993). Daraus kann die Hypothese abgeleitet werden, dass

eine temporäre Überexpression von IL-4 am Ort der Alloantwort zur Transplantatakzeptanz führen kann. Die Überexpression von IL-4 nach ex-vivo Gentransfer mit Hilfe von rekombinanten Adenoviren führte zu einer deutlichen Verlängerung der Transplantatakzeptanz im allogenen Nierentransplantationsmodell der Ratte im Vergleich zu unbehandelten oder mit einem Reporterkonstrukt behandelten Transplantaten (Kato et al., 1999a). Die Rolle von IL-4 in der Induktion von Toleranz gegenüber allogenen Transplantaten wird jedoch in der Literatur kontrovers diskutiert. So wurde gezeigt, dass die lokale Überproduktion von IL-4 entweder durch adenoviral transfizierte oder IL-4 transgene Transplantate nicht zu einer Verlängerung der Transplantatakzeptanz führt (Smith et al., 1997; Mueller et al., 1997). Auf der anderen Seite ist gezeigt worden, dass transgene, IL-4 produzierende Transplantate oder die systemische Applikation von IL-4 in Kombination mit Cyclosporin A die Überlebenszeit allogener Transplantate verlängern kann (Takeuchi et al., 1997; Rabinovitch et al., 1997). Dabei muss bemerkt werden, dass die Arbeiten methodisch oft unzulänglich dargestellt sind, so dass nicht entschieden werden kann, ob methodische Probleme einen Einfluss auf das Ergebnis haben.

Im Gegensatz zu IL-4 ist die Bedeutung von IL-10 für die Verlängerung der Transplantatakzeptanz weniger umstritten. So konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von TGF- β 1 und vIL-10, einem Epstein-Barr-Virus kodierten Homolog zu humanem oder murinem IL-10, zur Verlängerung der Transplantatakzeptanz in verschiedenen allogenen Herztransplantations-Modellen führt (Qin et al., 1995; Josien et al., 1998). Wir konnten zeigen, dass die Ko-applikation von IL-4 und vIL-10 mit Hilfe von rekombinanten Adenoviren das Überleben allogener Nierentransplantate in einem starken Abstoßungsmodell signifikant verlängerte (Kato et al., 1999b). Interessanterweise hat die alleinige Applikation von IL-4 in diesem Modell keinen Einfluss auf eine Verlängerung der Transplantatakzeptanz.

Auch die Überexpression von IL-12p40 scheint positive Effekte auf das Transplantatüberleben zu haben. So konnte gezeigt werden, dass die lokale Applikation von IL-12p40 die Th1-vermittelte Immunantwort inhibierte und die Abstoßung von allogenen Myoblasten, die mit der cDNA für IL-12p40 transfiziert waren, verhinderte (Kato et al., 1997). Ähnliche Ergebnisse wurden im Modell der Inselzell-Transplantation in diabetische Mäuse erhalten, wo die Überexpression von IL-12p40 die Th1-vermittelte Autoaggression verhinderte (Rothe et al., 1997; Kato et al., 1998). Wir konnten zeigen, dass die Ko-applikation von IL-4 und IL-12p40 mit Hilfe von rekombinanten Adenoviren das Überleben

allogener Nierentransplantate in einem starken Abstoßungsmodell signifikant verlängerte (Kato et al., 1999b).

Das Problem vieler Arbeiten zum Zytokinen-Transfer ist immer noch die Applikation des Zytokins. Die systemische Gabe eines Zytokins kann niemals ein lokales Milieu schaffen, welches der physiologischen Situation entspricht. Außerdem haben Zytokine im Serum eine sehr kurze Halbwertszeit, so dass das therapeutische Protein ständig nachgeliefert werden müsste, um einen gewünschten Serumspiegel zu erreichen (H.-D. Volk, pers. Mitteilung).

Durch adenovirus-vermittelten Gentransfer des Spenderorgans kann die Zytokinexpression im Transplantat gesteigert werden, sie ist aber meistens nur kurzzeitig und keinesfalls aktivierungsabhängig.

Retroviral transfizierte T-Zellen sind jedoch in der Lage, stabil und dauerhaft ein Protein zu exprimieren (Blaese et al., 1995). Besonders aktivierte T-Zellen exprimieren vermehrt ihr Transgen (Quinn et al., 1998; Hammer et al., 2000).

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, eine neue Möglichkeit zur Verhinderung der allogenen Transplantatrejektion bereitzustellen, welche die Nachteile der bekannten Mittel und Methoden beseitigt. Die Aufgabe wurde durch die Bereitstellung in vitro retroviral modifizierter alloreaktiver T-Zellen, die ein therapeutisches Gen exprimieren, gelöst.

Die Aufgabe, eine neue Möglichkeit zur Verhinderung der allogenen Transplantatrejektion zu eröffnen, wurde im einzelnen dadurch gelöst, dass T-Zellen des Transplantatempfängers in vitro durch Zellen des Transplantatspenders oder durch Zellen, die dominante MHC-Moleküle exprimieren, stimuliert und gleichzeitig mit Hilfe von Retroviren, die immunmodulierende (therapeutische, z.B. virales IL-10, IL-4, IL-12p40) Gene exprimieren, transduziert werden.

Die gewählten Versuchsbedingungen führen zur Generierung und Expansion der allo-spezifischen, transduzierten T-Zellen in vitro. Aufgrund ihrer Allo-Spezifität besitzen die modifizierten T-Zellen die Eigenschaft, nach der in vivo Applikation der Zellen zum Zeitpunkt einer allogenen Organtransplantation spezifisch in das allogene Transplantat einzuwandern und dort die immunmodulierenden (therapeutischen) Gene zu exprimieren.

Die Erfindung erlaubt es überraschenderweise, die Abstoßung allogener Transplantate (Zellen, Gewebe, Organe) effektiv zu verhindern.

Die erfindungsgemäßen modifizierten Zellen wandern also auf Grund ihrer Allo-Spezifität in das Transplantat ein. Überraschenderweise hat sich herausgestellt, dass durch die Produktion von IL-4, IL-10 und IL-12p40 in Abhängigkeit des Aktivierungsgrads der erfindungsgemäßen Zellen, direkt am Ort des Ag-Kontaktes ein lokales Milieu von Th2-Zytokinen bzw. Th1-

Antagonisten geschaffen wird. Damit ist es gelungen, IL-4, IL-10 oder IL-12p40 produzierende, alloreaktive T-Zellen durch retroviralen Gentransfer in vitro zu generieren.

Dabei wird auf die Expression des Transgens im transplantierten Gewebe selbst fokussiert. Bisher sind solche (generierte T-Zellen) Zellen hauptsächlich zur Tumorbekämpfung eingesetzt worden. Hierbei wurden *ex vivo* generierte tumorspezifische T-Zellen mit proinflammatorischen Zytokinen (wie beispielsweise TNF-alpha) transfiziert, die bei späterer Infiltration den Tumor und seine Metastasen „bekämpfen“.

Die erfindungsgemäßen in vitro retroviral modifizierten T-Zellen werden durch die Kokultur bzw. durch Koinkubation mit Zellkulturüberständen von sog. amphotropen Zelllinien gewonnen, die die rekombinanten Retroviren mit den therapeutischen Transgenen produzieren. Das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung der in vitro retroviral modifizierten T-Zellen besteht aus folgenden Schritten:

- Herstellung der entsprechenden Zelllinien, die die rekombinanten Retroviren mit den therapeutischen Transgenen produzieren. Dazu erfolgt eine Transfektion der Zelllinie mit einem retroviralen Vektor.

- Generierung der alloreaktiven T-Zellen in vitro. Dabei wird die Zelllinie, die das rekombinante Retrovirus mit dem therapeutischen Transgen produziert, in Kultur genommen. Außerdem wird eine gemischte Lymphozytenkultur (bestrahlte Spender T-Zellen mit Empfänger T-Zellen oder Zellen, die dominante MHC-Moleküle exprimieren), kultiviert. Danach wird eine Kokultivierung, bestehend aus der gemischten Lymphozytenkultur (Primär-MLC) und der retrovirus-produzierenden Zelllinie durchgeführt.

Als Vektoren können IL-4, IL-10, vIL-10 und IL-2p40 eingesetzt werden.

Die retroviral modifizierten T-Zellen können in verschiedene Applikationen (iv, ip), verschiedene Kombinationen davon und/oder verschiedene Dosierungen zu verschiedenen Zeitpunkten eingesetzt werden.

Die erfindungsgemäßen in vitro retroviral modifizierten T-Zellen eignen sich zur Verhinderung der allogenen Transplantatrejektion in vivo und können bei der Transplantation von allogenen Zellen, Geweben und Organen verwendet werden. Als Beispiele seien die Transplantation von Stammzellen, Haut, Niere, Herz, Leber oder Inseln genannt. Hierbei werden T-Zellen des Transplantatempfängers in vitro durch Zellen des Transplantatspenders oder durch Zellen, die dominante MHC-Moleküle exprimieren, stimuliert und gleichzeitig mit

Hilfe von Retroviren, die immunmodulierende Gene exprimieren, transduziert. Das Ergebnis ist eine Toleranzinduktion bzw. eine Toleranzerhaltung gegenüber allogenen Transplantaten.

Das Wesen der Erfindung besteht in einer Kombination bekannter - amphotrophe Zelllinien, retrovirale Vektoren, gemischte Lymphozytenkultur – und neuen Elementen – Kokultur aus der gemischten Lymphozytenkultur (Primär-MLC) und der den therapeutischen Retrovirus-produzierenden Zelllinie – was dazu führt, dass retroviral transduzierte T-Zellen entstehen, die therapeutische Gene exprimieren können und aufgrund der allo-Spezifität in das Allo-Transplantat einwandern können. Der Erfolg der Methode liegt darin, dass die Abstoßung allogener Transplantate (Zellen, Gewebe, Organe) effektiv verhindert wird und somit ein wirksames Mittel in der Transplantationsmedizin zur Verfügung gestellt wird.

Die erfindungsgemäße Verwendung von therapeutischen T-Zellen besteht in der Verhinderung der allogenen Transplantatrejektion. Die (in vitro) retroviral modifizierten T-Zellen finden als Mittel zur Toleranzinduktion und zur Erhaltung von Toleranz gegenüber allogenen Transplantaten (Zellen, Gewebe, Organe) und zur Stimulierung der T-Zellen des Transplantatempfängers Verwendung.

Die Erfindung soll anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert werden, ohne auf diese Beispiele begrenzt zu sein.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1: Herstellung der therapeutischen T-Zelllinien

Generierung der Zelllinien

Zunächst werden die entsprechenden Zelllinien, die die rekombinanten Retroviren mit den therapeutischen Transgenen produzieren hergestellt. Als Ausgangspunkt für die Produktion von infektiösem, replikations-inkompetenten Retrovirus dient die von NIH/3T3 abgeleitete Zelllinie PT67 (Retropack™, Clontech). PT 67 enthält die Gene gag, pol und env (10A1-Stamm) des Moloney Murine Leukemia Virus (MoMuLV). Die Zellen werden in DMEM 10% FKS, 4mM L-Glutamin, 100U/ml Penicillin und 100µg/ml Streptomycin bei 37°C in 5% CO₂-Atmosphäre gezüchtet. Die Transfektion dieser Zelllinie mit einem retroviralem Vektor, der nicht die o.g. Gene, jedoch ein therapeutisches Gen und ein Verpackungssignal beinhaltet,

erlaubt die Produktion von replikations-defizientem Retrovirus (d.h. das Virus kann seine Zielzellen infizieren, aber nicht in diesen replizieren und weitere Zellen infizieren) (Coffin et al., 1996; Ausubel et al., 1996). Die Transfektion der PT67-Zellen erfolgt mittels Calciumphosphat-Transfektion nach Standardprotokollen (Maniatis?). Durch Selektion mit G 418 (0,5 mg/ml) werden Klone und davon abgeleitet wiederum Zelllinien etabliert, die sowohl das replikations-defiziente Retrovirus als auch das therapeutische Gen produzieren. Im Falle von IL-4 und IL-10 können ELISA-Teste dazu herangezogen werden, die Zelllinien mit der höchsten Produktion des therapeutischen Gens bestimmen, die dann in allen weiteren Experimenten verwendet wird. Im Falle von IL-12p40 ist kein ELISA-Test zur Verfügung. Hier wird direkt die biologische Aktivität im Bioassay bestimmt (Hemmung der IFN- γ Produktion durch aktivierte Milzzellen).

Beispiel 2: Generierung der alloreaktiven T-Zellen in vitro

Ein bis zwei Tage, bevor die gemischte Lymphozytenkultur (bestrahlte Spender T-Zellen mit Empfänger T-Zellen kultivieren) angesetzt wird, wird die Zelllinie, die das rekombinante Retrovirus mit dem therapeutischen Transgen produziert, in Kultur genommen (DMEM+10%FKS + Selektionsantibiotikum G 418 0,5mg/ml Endkonzentration).

Am Tag 1 wird die Kokultur, bestehend aus der gemischten Lymphozytenkultur (Primär-MLC) und der retrovirus-produzierenden Zelllinie durchgeführt: Dazu werden die Zellen der Zelllinie trypsiniert, für 5 Minuten bei 1.200 U/min zentrifugiert und in T-Zell Medium (TCM) ohne FKS aufgenommen. Danach werden die Zellen gezählt und auf eine Dichte von 2×10^5 - 2×10^6 Zellen/pro 96er Platte ausgesät. Zunächst lässt man die Zellen für 3-4 Stunden in CO₂-Inkubator (5%CO₂) bei 37°C anwachsen, bevor die T-Zellen zugegeben werden.

Die T-Zellen des Transplantatempfängers werden zuvor aus dem peripheren Blut mit Hilfe eines Fikollgradienten nach Standardprotokollen isoliert. Zur Antigenpräsentation werden die Zellen des Transplantatspenders (T-Zellen) ebenfalls nach Standardprotokoll isoliert. Im Falle der Verwendung von Zelllinien, die dominante MHC-Epitope exprimieren, werden diese 1-2 Tage vorher aufgetaut und im CO₂-Inkubator bis zur Verwendung kultiviert.

Die Zellen, die zur Antigen-Präsentation dienen (als Stimulatorzellen für die T-Zellen des Transplantatempfängers), müssen vor der Zugabe zur gemischten Lymphozytenkultur für 10 Minuten bei 30 Gy (in DMEM + ?) bestrahlt werden, um diese an der unerwünschten Proliferation zu hemmen.

Nach der Bestrahlung der antigen-präsentierenden Zellen werden diese zentrifugiert und in 20 ml TCM ohne FKS aufgenommen. Danach wird die Zellzahl bestimmt und 50µl TCM mit je $3,5 \times 10^5$ - 4×10^5 Zellen des Transplantatempfängers und der antigen-präsentierenden Zellen in 3% autologem Serum und 4µg/ml Polybren in 96well Rundbodenplatten ausplattiert (Gesamtvolumen 100µl) und bei 37°C im CO₂-Inkubator bei völliger Ruhe inkubiert.

Tag 5:

Am Tag fünf erfolgt die Umsetzung der MLC aus Rundbodenplatten in Flachbodenplatten. Hierzu werden ca. 50µl des Kulturüberstandes abpipettiert (wird verworfen) und die T-Zellen werden durch 2-3maliges Resuspendieren ohne Luftblasen in eine 96well Flachbodenplatte überführt. Außerdem werden 100µl TCM-HC Medium, welches frisch angesetzt werden sollte, hinzugegeben werden. Die Zellen werden für weitere 24 Stunden bei 37°C unter CO₂-Atmosphäre (5%) kultiviert.

Tag 6:

Am Tag 6 erfolgt die G 418 Selektion, d.h. alle Zellen, im die Zuge des retroviralen Gentransfers nicht transduziert wurden, gehen im Rahmen der G 418-Selektion zugrunde. Umgekehrt überleben nur die Zellen die G 418-Selektion, die durch das Retrovirus transduziert wurden. Von dieser Stufe an sind die Zellen immer unter G 418 zu kultivieren (0,4mg/ml G-418 Endkonzentration). In diesem Medium werden die Zellen für weitere 48 Stunden kultiviert.

Tag 8: Restimulation 2"

Am Tag acht nach der ersten Stimulation erfolgt die Restimulation der Zellen. Hierfür werden, wie schon für die erste Stimulation beschrieben, entweder PBMC des Transplantatspenders oder Zelllinien, die dominante MHC-Epitope exprimieren, eingesetzt. Die Zellen werden wiederum bestrahlt (10 min, 30 Gy), danach zentrifugiert (1.200 Upm, 5 min) und danach in 20 ml TCM ohne FKS aufgenommen und die Zellzahl bestimmt. Für die Restimulation werden zunächst 100µl aus der 96well Mikrotiterplatte, die die MLC-Zellen enthält, entnommen und mit 6×10^5 Stimulatorzellen versetzt. Außerdem wird auf 2.5% autologem Serum und einer G 418 Konzentration von 0.4 mg/ml eingestellt. Danach werden die Zellen für weitere zwei Tage inkubiert.

Tag 10:

Am Tag 10 erfolgt die Zugabe von frischem TCM-HC Medium (100µl abziehen und Zugabe von 100µl TCM-HC + G 418, 0.4mg/ml). Danach werden die Zellen für weitere zwei Tage inkubiert.

Tag 12:

In allen Vertiefungen der Zellkulturplatten sollten sich proliferierende Zellen (Blasten) befinden, die durch weitere Restimulationsschritte vermehrt werden können, um eine genügend grosse Anzahl an Zellen für die Applikation in der Klinik verfügbar zu haben. Am Tag 12 besteht zusätzlich die Möglichkeit, die generierten Blasten über einen Fikollgradienten zu reinigen und zu isolieren (Ficoll 3000). 24 Stunden nach dem Gradienten erfolgt die nächste Restimulation (3'').

Zur Stimulation können PBMC-Zellen des Transplantatspenders oder Zelllinien, die dominante MHC-Moleküle exprimieren oder Zelllinien, die mit den Genen für diese Moleküle transfiziert sind und diese konstitutiv exprimieren (K. Wood) eingesetzt werden.

Beispiel 3: Alternativen zur Kokultur

Anstelle der Kokultur mit der amphotrophen Zelllinie soll nur der retrovirus-haltige Zellkulturüberstand der amphotrophen Zelllinie zur Transduktion der T-Zellen herangezogen werden.

Beispiel 4: Der Bioassays: Nachweis des therapeutischen Gens im Überstand kann erfolgen durch:

IL-4, ELISA, MHC-II Hochregulation auf Milzzellen

vIL-10, ELISA, Inhibition der TNF- α Produktion durch Makrophagen, Verringerung der MHC-II Expression auf Monozyten

IL-12p40, kein ELISA, Inhibition der Produktion von IFN- γ nach Stimulation von Milzzellen.

25 **Literatur**

Bagley, J., Aboody-Guterman, K., Breakefield, X., Iacomini, J. Long-term expression of the gene encoding green fluorescent protein in murine hematopoietic cells using retroviral gene transfer. Transplantation 1998, 65, 1233-1240.

30 Blaise, R.M., Culver, K.W., Miller, D., Carter, C., Fleisher, T., Clerici, M., Shearer G., Chang, L., Chiang, Y., Tolsthev, P., Grennblatt, J.J., Rosenberg, S.A., Klein, H., Berger, M., Mullen, C.A., Ramsey, W.J., Muul, L., Morgan, R.A., Anderson, W.F., T-Lymphocyte-Directed Gene Therapie for ADA- SCID: Initial Trial Results After 4 Years. Science 1995, 270:475-477

Cobbold, S. & Waldmann, H., How do monoclonal antibodies induce tolerance? A role for Infectious Tolerance? Annual Reviews Immunology 1998,16:619-644

Campos, L., Naji, A., Deli, B.C., Kern, J.H., Kim, J.I., Barker, C.F., Markmann J.F., Survival of MHC-Deficient Mouse Heterotopic Cardiac Allografts. Transplantation 1995, 59:187-191

Flügel, A., Willem, M., Berkowicz, T., Wekerle, H. Gene transfer into CD4+ T lymphocytes: Green fluorescent protein-engineered, encephalitogenic T cells illuminate brain autoimmune responses. Nature Med. 1999,7: 843-847

Hammer, M., Flügel, A., Seifert, M., Lehmann, M., Brandt, C., Volk, H.-D., Ritter, T. Potential of allspecific gene-engineered T cells in transplantation gene therapy: specific T-cell activation determines transgene expression *in vitro* and *in vivo*. 1999. Human Gene Therapy, submitted

Lehmann, M., F. Sternkopf, F. Metz, J.Brock, W.-D. Döcke, A. Plantikow, B. Kuttler, H.J.Hahn, B. Ringel, H.-D. Volk. A novel high-efficient anti-CD4 monoclonal antibody induces long-term survival of rat skin allografts. Transplantation 1992, 54: 959-962

Lehmann, M., Kuttler, B., Siegling, A., Fordalla, A., Riedel, H., Lacha, J., Hahn, H.-J., Brock, J., Volk, H.-D. Characterization of the anti-CD4-induced permanent acceptance of rat renal allografts. Transplantation Proc. 1993, 25: 2859.

Lehmann M, Graser E, Risch K, Hancock WW, Muller A, Kuttler B, Hahn HJ, Kupiec-Weglinski JW, Brock J, Volk HD. Anti-CD4 monoclonal antibody-induced allograft tolerance in rats despite persistence of donor-reactive T cells. Transplantation 1997 Oct 27; 64(8):1181-7

Mosmann, T.R. & Coffmann, R.L., Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to a different functional properties. Annual Reviews Immunology 1989,7:145-173

Ode-Hakim, S., Döcke, W.D., Kern, F., Volk, H.D., Reinke, P. DTH-like mechanisms in late acute rejection - role of CD 4+ T lymphocytes. Transplantation 1996, 61: 1233-1340

Onodera, K., Lehmann, M., Akalin, E., Volk, H.-D., Sayegh, M.H., Kupiec-Weglinski, J.W. Induction of „infectious,, tolerance to MHC-incompatible cardiac allografts in CD4 monoclonal antibody-treated sensitized rat recipients. J. Immunol. 1996a, 157: 1944-1950

Onodera, K., Hancock, W.W., Graser, E., Lehmann, M., Volk, H.-D. Sayegh, M.H., Strom, T. B., Kupiec-Weglinski, J.W. Th2-cytokines and the development of „infectious,, tolerance in rat cardiac allograft recipients. J. Immunol., 1997, 159: 1572-1581

Qin, S., Cobbold, S.P., Pope, H., Elliott, J., Kioussis, D., Davies, J., Waldmann, H. „Infectious,, transplantation tolerance. Science, 1993, 259: 974-977

Qin, L., Chavin, K., Ding, Y., Favaro, J. P., Woodward, J. E., Lin, J., Tahara, H., Robbins, P., Shaked, A., Ho, D. Y., Sapolsky, R. M., Lotze, M. T., Bromberg, J. S. Multiple vectors effectively achieve gene transfer in a murine cardiac transplantation model. Transplantation 1995, 59: 809-816

Quinn, E.R., Lum, L.G., Trevor, K.T., T cell activation modulates retrovirus-mediated gene expression. Human Gene Therapie 1998, 9:1457-1467

Ritter, T., Risch, K., Schroeder, G., Kolls, J., Siegling, A., Graser, E., Reinke, P., Brock, J., Lehmann, M., Volk, H.D. Intragraft overexpression of IL-4 neither sufficient nor essential for tolerance induction to cardiac allografts in high-reponder strain combinations. Transplantation 1999, 15: 1427-1430.

Sayegh, M.H., Akalin, E., Hancock, W.W., Russel, M.E., Carpenter, C.B., Turka, L.A. CD28/B7 blockade after alloantigenic challenge in vivo inhibits Th1 cytokines but spares Th2. 1995. J. Exp. Med. 178: 1801-06

Siegling, A., M. Lehmann, H. Riedel, C. Platzer, J. Brock, F. Emmrich, H.-D. Volk. A nondepleting anti-rat monoclonal antibody which suppresses T helper 1-like but not T helper 2-like intragraft lymphokine secretion induces long-term survival of renal allografts. Transplantation 1994a, 57: 464-467

Siegling, A., M. Lehmann, C. Platzer, F. Emmrich, H.-D. Volk. A novel multispecific competitor fragment for quantitative PCR analysis of cytokine gene expression in rats. 1994b. J. Immunol. Meth. 177: 23-28

Suzuki, T., Taghara, H., Narula, S., Moore, K.W., Robbins, P.D., Lotze, M.T. Viral Interleukin 10 (IL-10), the Human Herpes Virus 4 Cellular IL-10 Homologue, Induces Local Anergy to Allogenic and Syngenic Tumors. J.Exp.Med. 1995, 182:477-486

Takeuchi T., Ueki, T., Sunaga S., Ikuta K., Sasaki Y., Li B., Moriyama N., Miyazaki J., Kawabe K.
Murine interleukin 4 transgenic heart allograft survival prolonged with down-regulation of the Th1
cytokine mRNA in grafts. Transplantation 1997 Jul 15;64(1):152-7

- 5 VanBuskirk, A.M., Wakely, M.E., Orosz, C.G. Transfusion of polarized TH2-like cell populations
into SCID mouse cardiac allograft recipients results in acute allograft rejection. Transplantation 1996
Jul 27;62(2):229-38

10

Abkürzungsverzeichnis

	Ag	Antigen
	Ak	Antikörper
	APC	Antigen-präsentierende Zellen
15	B-Zellen	B-Zellen
	B7-Moleküle	Oberflächenmarker auf APC, wichtig für die Aktivierung von T-Zellen
	cDNA	complementary DNA, copy DNA
	CD	cluster of differentiation, Nomenklatur für Oberflächenmoleküle
	CD4	spezifischer Oberflächenmarker auf T-Helfer-Zellen
20	(RIB 5/2)	Bezeichnung für einen gegen das CD4-Molekül gerichteten monokl. Antikörper
	CD8 T-	spezifischer Oberflächenmarker auf zytotoxischen T-Zellen
	CTLA4-Ig	Fusionsprotein, bestehend aus CTLA-4 (cytotoxic T-cell late antigen) und dem Fc-Teil des IgG-Antikörpers
25	DMEM	Dulbeccos' modifiziertes Eagle's Medium
	DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonucleinsäure)
	ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
	gy	Gray (Gy)
	FKS	Fetales Kälberserum
30	IFN	Interferon
	Ig	Immunglobulin
	IL	Interleukin
	kDa	Kilo-Dalton
	mAk	monoklonale(r) Antikörper

	MHC	Major Histocompatibility Complex
	MLC	Mixed Lymphocyte Culture
	mRNA	Messenger-Ribonucleinsäure
	NIH/3T3	Maus-Fibroblasten
5	NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
	OKT3	mAk gegen CD3
	PBMC	peripheral blood mononuclear cells
	PCR	polymerase chain reaction (Polymerase Kettenreaktion)
	PHA	Phytohämagglutinin
10	SCID-Mäuse	immundefiziente Mäuse, die keine B- und T-Zellen besitzen
	TCM	T-Zell Medium
	TCM-HC Medium	T-Zell Medium mit Pferdeserum-Bestandteil und Con A als polyklonales Aktivierungssignal
	TCR-Signal	T-Zell-Rezeptor
15	TGF	transforming growth factor
	T-Lymphozyten	Thymusabhängige oder -stämmige Lymphozyten
	T-Zellen	dem Thymus entstammende T-Lymphozyten
	Th1-Zellen	T-Zellen mit T-helfer1-Phänotyp
	Th2	T-Zellen mit T-helfer2-Phänotyp
20	TNF	Tumornekrosefaktor
	vIL-10	virales Interleukin-10, entstammt aus Epstein-Barr-Virus, hat hohe AS-Homologie zum humanen IL-10

Patentansprüche

1. (In vitro) retroviral modifizierte alloreaktive T-Zellen, dadurch gekennzeichnet, dass sie ein therapeutisches Gen exprimieren.
2. (In vitro) retroviral modifizierte alloreaktive T-Zellen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass sie
 - a) IL-4 oder
 - b) IL-10 oder
 - c) IL-12p40produzieren.
3. (In vitro) retroviral modifizierte T-Zellen nach Anspruch 1 und 2, erhalten durch retroviralen Gentransfer.
4. Verfahren zur Herstellung von retroviral modifizierten T-Zellen nach einem der Ansprüche 1 bis 3, gekennzeichnet durch folgende Schritte:
 - Herstellung der entsprechenden Zelllinien, die die rekombinanten Retroviren mit den therapeutischen Transgenen produzieren
 - Generierung der alloreaktiven T-Zellen in vitro.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass eine Transfektion der Zelllinie mit einem retroviralen Vektor in vitro erfolgt.
6. Verfahren nach Anspruch 4 und 5, dadurch gekennzeichnet, dass als retrovirale Vektoren
 - a) IL-4 oder
 - b) IL-10 oder
 - c) vIL-10 oder
 - d) IL-2p40 oder
 - e) mögliche Kombinationen davoneingesetzt werden.
7. Verfahren nach Anspruch 4 und 5, dadurch gekennzeichnet, dass,

- a) die Zelllinie, die das rekombinante Retrovirus mit dem therapeutischen Transgen produziert, in Kultur genommen wird
- b) eine gemischte Lymphozytenkultur (bestrahlte Spender T-Zellen mit Empfänger T-Zellen oder Zellen, die dominante MHC-Moleküle exprimieren), kultiviert wird und
- c) eine Kokultivierung, bestehend aus der gemischten Lymphozytenkultur (Primär-MLC) und der retrovirus-produzierenden Zelllinie, durchgeführt wird.

8. Verwendung der (in vitro) retroviral modifizierten T-Zellen in der Transplantationsmedizin.

9. Verwendung nach Anspruch 8 zur Verhinderung der allogenen Transplantatrejektion in vivo.

10. Verwendung nach Anspruch 8 und 9 als Mittel zur Toleranzinduktion und zur Erhaltung von Toleranz gegenüber allogenen Transplantaten (Zellen, Gewebe, Organe).

11. Verwendung nach Anspruch 8 bis 10 zur Stimulierung der T-Zellen des Transplantatempfängers.